

11AP20 RECEIVED 04 JAN 2006

APPLICATIONS D'UNE NOUVELLE CLASSE D'ENZYMES : LES SULFIREDOXINES

La présente invention est relative aux applications d'une nouvelle classe d'enzymes, les sulfirédoxines (Srx), qui catalyse la réduction des dérivés Cys-SO₂H (cystéine-acide sulfinique) et notamment la réduction de la peroxyrédoxine (Prx) sous sa forme Cys-SO₂H en dérivé thiol.

Dans les protéines, certains groupes thiols de cystéine (Cys-SH), ayant une activité rédox, peuvent être oxydés par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en acide sulfénique (Cys-SOH). Celui-ci étant instable, réagit soit avec n'importe quel groupe thiol proche pour former un pont disulfure (C-S-S-C), soit, en l'absence de groupe thiol proche accessible, le composé Cys-SOH peut être davantage oxydé en acide sulfinique (Cys-SO₂H) stable ou acide cystéique (Cys-SO₃H).

Les peroxyrédoxines (Prxs) sont des enzymes antioxydantes comportant de telles cystéines à activité redox. Par exemple, les 2-Cys Prxs sont des homodimères inversés avec 2 cystéines à activité rédox par sous-unité. Elles catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène.

Le site catalytique de ces enzymes comprend deux cystéines à activité redox (cystéine N-terminale peroxydatique (Cys_P) et cystéine C-terminale de résolution (Cys_R)).

De manière plus précise le cycle catalytique de ces peroxyrédoxines comprend (Wood ZA et al., Science, 2003, 300, 650-653 ; Wood et al., *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28, 1, 32-40) :

- l'oxydation de la Cys_P-SH en Cys_P-SOH (acide sulfénique) par H₂O₂ ;
- la formation d'un pont disulfure entre la Cys_P et la Cys_R de la deuxième sous-unité de Prx (Cys_P-S-S-Cys_R) (processus lent) ;
- la réduction de ce pont disulfure par des réducteurs cellulaires classiques tels que le glutathion ou la thiorédoxine (Trx), pour obtenir le produit de départ Cys-SH.

Dans certains cas, les Prxs peuvent être inactivées, par super-oxydation de la Cys_P-SOH en acide sulfinique (Cys_P-SO₂H) ; cette réaction de super-oxydation était considérée jusqu'à présent comme irréversible, (Wood ZA et al., Science,

BEST AVAILABLE COPY

2003, 300, 650-653). Récemment (Woo HA et al., Science, 2003, 300, 653-656 ; Georgiou G. et al., Science, 2003, 300, 592-594), la réversion de la Cys-acide sulfinique en composé Cys-SH a été montré *in vivo* dans le cas de la peroxyrédoxine à deux cystéines (2-Cys Prx) de mammifère, indiquant l'existence d'une réductase
5 spécifique, qui n'a cependant pas été identifiée. Plus précisément, ces auteurs ont montré que, par marquage métabolique de cellules de mammifères avec du ^{35}S , la forme sulfinique de la peroxidine I, produite lors de l'exposition des cellules au H_2O_2 , est rapidement réduite en forme thiol catalytiquement active. Ces auteurs pensent que la réduction de l'acide sulfinique observée lors de ces études nécessite l'intervention
10 d'enzymes spécifiques, qui n'ont pas été identifiées. Etant donné que les Prxs de mammifères régulent la signalisation médiée par H_2O_2 , leur inactivation réversible pourrait servir dans le processus de régulation.

Les peroxyrédoxines (Chae et al., P.N.A.S., 1994, 91, 7022-7026) sont des antioxydants ubiquitaires, qui contrôlent, dans de nombreuses espèces
15 (microorganismes, plantes et organismes supérieurs y compris les mammifères), les taux de H_2O_2 , qui régulent les cascades de signalisation conduisant à une prolifération cellulaire, une différenciation et une apoptose (Fujii J. et al., Redox Rep., 2002, 7, 123-130).

Les Inventeurs ont maintenant identifié la famille d'enzymes qui
20 réduisent les Prxs $\text{Cys}_2\text{-SO}_2\text{H}$. Il s'agit d'une protéine qui comprend au moins un site catalytique présentant le motif suivant : FXGCHR, avec X= G ou S et qui a un poids moléculaire d'environ 8 à 14 kDa.

Cette enzyme est conservée chez les eucaryotes et est dénommée ci-après sulfirédoxine (Srx). Chez la levure et en particulier chez *Saccharomyces*
25 *cerevisiae*, cette enzyme est dénommée Srx1 et a un poids moléculaire de 13 kDa. Chez l'homme, cette enzyme est dénommée hSrx1 et a un poids moléculaire de 13,6 kDa.

Des séquences polypeptidiques identiques à celles de la sulfirédoxine ainsi que les séquences nucléotidiques correspondantes figurent dans la base
30 de données de séquences NCBI ou GenBank, sous les numéros d'accès suivants : *S. cerevisiae* : YKL086W, *Homo sapiens* : AAH47707, CAC28314, *M. musculus* : BAB24939, AAH11325, *Arabidopsis thaliana* : AAD21682, AAO42977, *Oryza*

sativa : BAA95812, *Schizosaccharomyces pombe* : SPBC106.02c, *Thermosynechococcus elongatus* : BAC07716, *Drosophila melanogaster* : AAF48773, *Nostoc* sp. (PCC7120) : NP_488186.

5 En revanche, aucune fonction n'a été attribuée à ces séquences polypeptidiques, dans la base de données de séquences NCBI ou GenBank.

Les Inventeurs ont maintenant trouvé un point commun entre ces différentes protéines : le site catalytique précité et une fonction : la catalyse de la réduction des Prxs Cys_P-SO₂H.

10 La réaction catalysée par la sulfirédoxine (Srx) est résumée à la figure 1.

La présente invention a en conséquence pour objet l'utilisation d'une protéine dénommée sulfirédoxine (Srx), qui comprend au moins un site catalytique présentant le motif suivant : FXGCHR, avec X= G ou S, pour catalyser la réduction des peroxyrédoxines (Prxs) sous leur forme super-oxydée Prx-Cys_P-SO₂H (peroxy-
15 rédoxine cystéine acide sulfinique) en dérivé thiol (SH).

La sulfirédoxine joue donc un rôle très important dans la fonction antioxydante des peroxyrédoxines et est impliquée dans la réparation ou le contrôle des protéines modifiées par la formation d'une cystéine-acide sulfinique.

20 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ladite sulfirédoxine est une sulfirédoxine de microorganisme, de plante ou d'organisme supérieur, qui comprend généralement entre 80 et 170 acides aminés et au moins le site catalytique présentant le motif suivant : FXGCHR, avec X= G ou S. Elles présentent entre elles les pourcentages d'identité et de similarité suivants :

- 25 . levure/homme : 31 % d'identité et 67 % de similarité
- . levure/plantes : 23 % d'identité et 39 % de similarité
- . levure/souris : 31 % d'identité et 51 % de similarité
- . levure/champignons : 80 % d'identité et 90 % de similarité.

Conformément à l'invention, l'identité d'une séquence par rapport à une séquence de référence (SEQ ID NO :1 correspondant à la séquence de la Srx1 de
30 *S. cerevisiae*) s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques, lorsque les séquences correspondant à la région catalytique telle que

définie ci-dessus sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % d'identité avec la séquence de référence SEQ ID NO: 1 est définie, dans la présente invention comme une protéine qui peut inclure jusqu'à 100-X altérations pour 100 acides aminés de la séquence SEQ ID NO: 1. Au sens de la présente invention, le terme altération inclut les délétions, les substitutions ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence. Cette définition s'applique, par analogie, aux molécules d'acide nucléique.

La similarité d'une séquence par rapport à la séquence de référence SEQ ID NO: 1 s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives, lorsque les séquences sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente invention, on entend par substitution conservative, la substitution d'un acide aminé par un autre qui présente des propriétés chimiques similaires (taille, charge ou polarité), qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de la protéine.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % de similarité avec la séquence SEQ ID NO: 1 est définie, dans la présente invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations non-conservatives pour 100 acides aminés de la séquence de référence. Au sens de la présente invention, le terme altérations non-conservatives inclut les délétions, les substitutions non-conservatives ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence SEQ ID NO: 1.

Ladite sulfirédoxine est notamment sélectionnée parmi les protéines dont les séquences correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 1 à 10, illustrées aux figures 2 et 3 ou représentées dans la liste de séquences : *S. cerevisiae* : SEQ ID NO :1 ; *C. albicans* : SEQ ID NO :2 ; *S. pombe* : SEQ ID NO :3 ; *H. sapiens* : SEQ ID NO :4 ; *M. musculus* : SEQ ID NO :5 ; *D. melanogaster* : SEQ ID NO :6 ; *A. thaliana* : SEQ ID NO :7 ; *T. elongatus* : SEQ ID NO :8 ; *Nostoc sp.* : SEQ ID NO :9 et *Oryza sativa* : SEQ ID NO :10.

La présente invention a également pour objet un peptide isolé, correspondant au site catalytique de la Srx, caractérisé en ce qu'il est défini par la séquence suivante : FXGCHR, avec X = S.

La présente invention a également pour objet des anticorps anti-Srx, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par immunisation convenable d'un animal avec une protéine Srx, définie par une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les SEQ ID NO : 1-3, 5-6 et 8-10 ou le peptide FXGCHR, avec X = S.

Lesdits anticorps sont soit des anticorps polyclonaux, soit des anticorps monoclonaux.

La présente invention a également pour objet un médicament, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace d'une protéine définie par une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les SEQ ID NO-1-3 et 5-10 et éventuellement au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'une protéine telle que définie ci-dessus pour la préparation d'un médicament antioxydant destiné à traiter les cancers, les troubles neurodégénératifs et les maladies neuromusculaires, dans lesquels l'on observe une défaillance du système antioxydant Prx/Srx.

La présente invention a également pour objet un procédé de dépistage de maladies liées au cancer, au vieillissement, aux maladies neurodégénératives et aux maladies neuromusculaires, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend, pour évaluer l'implication du système antioxydant Prx/Srx :

(1) la mise en contact *in vitro* des cellules d'un échantillon biologique avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2),

(2) la détection de la Prx-Cysp-SO₂H formée, entre 1 heure et 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (1), et

(3) l'établissement du rapport des quantités de Prx-Cysp-SO₂H et de Prx-Cysp-SH, à partir de 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (1).

L'échantillon biologique est notamment constitué de cellules sanguines.

Des rapports Prx-Cysp-SO₂H/ Prx-Cysp-SH > 1 sont le signe d'une pathologie du système antioxydant Prx/Srx, liée à un dysfonctionnement de la Srx.

Ainsi, un tel procédé permet d'évaluer si le système antioxydant Prx/Srx fonctionne normalement au non. La connaissance des mécanismes impliqués dans l'étiologie de la maladie permet de sélectionner le traitement le plus adapté à la situation, notamment dans les cas de systèmes antioxydants Prx/Srx défaillants.

5 En variantes, ledit procédé de dépistage comprend :

A. le génotypage de la sulfirédoxine, à partir de l'ARN total d'un échantillon biologique convenable, notamment des cellules sanguines.

De manière plus précise, ledit procédé comprend :

10 (1) l'extraction de l'ARN total, à partir d'un échantillon biologique convenable,

(2) la préparation d'ADNc spécifique de la sulfirédoxine, par amplification de l'ARN à l'aide des deux amorces suivantes :

GTCCCGCGGCGGCGGCGACG (SEQ ID NO :11)

AGCAGGTGCCAAGGAGGCTG (SEQ ID NO :12),

15 ces séquences étant situées respectivement en amont et en aval de l'ORF de la sulfirédoxine humaine (GenBank n° AAH47707),

(3) l'établissement de sa séquence nucléotidique et

20 (4) la comparaison par rapport à une séquence d'ADN codant pour une protéine Srx, telle que définie ci-dessus, issue de la même espèce que celle de l'échantillon biologique à analyser.

B. la quantification relative, par tout moyen approprié, de l'ARNm codant pour la sulféridoxine humaine (hSrx1) à partir des ADNc totaux préparés à partir d'un échantillon biologique humain, par comparaison avec un échantillon de référence.

25 L'échantillon de référence est en particulier un échantillon obtenu à partir d'un sujet témoin sain.

Conformément à l'invention, préalablement à ladite quantification, ledit procédé comprend une étape d'extraction des ARN totaux.

30 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, ladite quantification comprend :

(a1) la préparation d'ADNc à partir de l'ARN total par transcription inverse avec des amorces appropriées et notamment des amorces aléatoires hexanucléotidiques ;

5 (a2) l'amplification dudit ADNc en présence de la paire d'amorces :
GTCCCGCGGCGGCGGCGACG (SEQ ID NO :11)
AGCAGGTGCCAAGGAGGCTG (SEQ ID NO :12),
en présence d'un reporter fluorescent et de façon simultanée ou séquentielle,

10 (a3) la détection de la quantité de l'amplimère (ou amplicon) par mesure du signal fluorescent.

L'amplification de l'ARNm est effectuée par RT-PCR ; les étapes de transcription inverse et d'amplification PCR sont, soit dissociées et dans ce cas la quantification est réalisée par PCR-quantitative, soit elles sont couplées et dans ce cas la quantification est réalisée par RT-PCR quantitative.

15 De préférence, ladite quantification est réalisée à l'aide d'un étalon interne comme par exemple, la sous-unité 18S d'ARN ribosomal.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, le reporter fluorescent est sélectionné dans le groupe constitué par des agents se liant à l'ADN double-brin et des sondes fluorescentes.

20 De préférence, ladite quantification est réalisée en temps réel, c'est-à-dire que la détection et la quantification du signal fluorescent émis sont effectuées pendant le processus d'amplification, dans la mesure où l'augmentation du signal est directement proportionnelle à la quantité d'amplimères produits durant la réaction.

25 Les principes généraux de la PCR et de la RT-PCR quantitatives en temps réel, ainsi que les différentes techniques de détection quantitative des amplimères : à l'aide d'agents se liant à l'ADN double-brin (agents intercalants : bromure d'éthidium, SYBR Green I, YO-PRO-1 ; agents se fixant au sillon mineur : Hoechst 33258) ou à l'aide de sondes fluorescentes, à savoir : hydrolyse de sondes par l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase (TaqMan™), hybridation de 2 sondes
30 (Hybprobes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers), sont connues de l'Homme du métier et sont notamment décrites dans Poitras et al., Reviews in Biology and Biotechnology, 2002, 2, 1-11. La PCR et

la RT-PCR quantitative en temps réel à l'aide de sondes du type TaqMan™ sont notamment décrites, respectivement dans Heid C. et al. (Genome Research, 1996, 6, 986-994) et Gibson U. et al. (Genome Research, 1996, 6, 995-1001).

5 Selon une modalité avantageuse de ce mode de mise en œuvre, lorsque ledit reporter fluorescent est une sonde, il est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par les sondes définies par les séquences suivantes :
TTAATTGAATTCATGGGGCTGCGTGCAGGAGG (SEQ ID NO :13) et
TTTTCCTTTTGCGGCCGCCTACTACTGCAAGTCTGGTGTGGATG (SEQ ID
NO :14).

10 L'extraction de l'ARN, la préparation de l'ADNc et l'établissement de la séquence sont réalisées en utilisant les techniques classiques, selon les protocoles standards tels que ceux décrits dans Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

15 La présente invention a également pour objet un procédé de dépistage de maladies liées au cancer, au vieillissement, aux maladies neurodégénératives et aux maladies neuromusculaires, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

20 - l'immunodétection de la protéine Srx dans un échantillon biologique à tester, à l'aide d'un anticorps obtenu par immunisation convenable d'un animal avec une protéine Srx ou le peptide FXGCHR, avec X=G ou S, après séparation des protéines totales par électrophorèse, puis

20 - l'évaluation de la qualité et de la quantité de ladite protéine Srx par rapport à une protéine Srx contrôle.

Ladite détection-quantification est avantageusement réalisée par la méthode du Western blot.

25 La présente invention a également pour objet l'utilisation de la séquence codant pour une protéine Srx, telle que définie ci-dessus ou d'un vecteur contenant ladite séquence codante, pour l'obtention de plantes dont les capacités de résistance au stress (sécheresse, froid, chaleur toxiques oxydants présents dans l'environnement) sont significativement augmentées.

30 Les séquences codant pour la protéine Srx peuvent être aisément obtenues à partir des bases de données de séquences précitées.

La présente invention a également pour objet des cellules hôtes, caractérisées en ce qu'elles sont transformées par un vecteur recombinant contenant une séquence codant pour une protéine Srx, définie par une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les SEQ ID NO :1-3, 5-6 et 8-10.

5 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte, elle est constituée par une souche de *S. cerevisiae* surexprimant le gène *SRX1*.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte, elle est constituée par une cellule de mammifère modifiée par un vecteur surexprimant le gène hSrx1.

10 Le vecteur est avantageusement un vecteur navette *E. coli/S. cerevisiae* comprenant au niveau d'un site de clonage, la séquence codant pour la protéine Srx et le promoteur du gène *Srx*. Il s'agit notamment du plasmide pRS316 (n° ATCC 77145).

Le promoteur du gène *Srx* est 400 paires de bases en amont du site d'initiation de la traduction ; il est repérable sur le site <http://www.yeastgenome.org/> (n° d'accès YKL086W).

Ces cellules hôtes transformées par un tel vecteur sont particulièrement intéressantes pour l'étude du système antioxydant Prx/Srx et le criblage *in vitro* de médicaments modulant l'activité du système antioxydant Prx/Srx.

20 En conséquence, la présente invention a également pour objet un procédé de criblage de médicaments aptes à moduler l'activité du système antioxydant Prx/Srx, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) la mise en contact de la substance à cribler avec des cellules hôtes selon l'invention, en présence de peroxyde d'hydrogène,

25 (2) la détection de la Prx-Cysp-SO₂H formée, entre 1 heure et 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (1),

(3) l'établissement du rapport des quantités de Prx-Cysp-SO₂H et de Prx-Cysp-SH, à partir de 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (1).

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage
30 de médicaments utiles dans le traitement des cancers, des maladies neurodégénératives et des maladies neuromusculaires, liés à une défaillance du système antioxydant Prx/Srx, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) la mise en contact de la substance à tester avec un extrait de cellules hôtes modifiées telles que définies ci-dessus ou un échantillon biologique d'un animal transgénique non humain, notamment des souris, sélectionné dans le groupe constitué par des animaux dans lesquels le gène de la protéine Srx est invalidé et des animaux dans lesquels le gène de la protéine Srx, est surexprimé en présence de peroxyde d'hydrogène,

b) la mesure par tout moyen approprié, de l'activité antioxydante du système Prx/Srx du mélange obtenu en a), et

c) la sélection des substances capables de stimuler ou d'inhiber ladite activité.

La mesure de ladite activité est notamment effectuée par la détection de la Prx-Cys_p-SO₂H formée, entre 1 heure et 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (a) et l'établissement du rapport des quantités de Prx-Cys_p-SO₂H et de Prx-Cys_p-SH, à partir de 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (a).

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage de médicaments utiles dans le traitement des cancers, des maladies neurodégénératives et des maladies neuromusculaires, liés à une défaillance du système antioxydant Prx/Srx, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) la mise en contact de la substance à cribler avec des mammifères transgéniques non-humains, notamment des souris, sélectionné dans le groupe constitué par des animaux dans lesquels le gène de la protéine Srx est invalidé et des animaux dans lesquels le gène de la protéine Srx est surexprimé, et

(2) la mesure de la survie de l'animal.

L'obtention de mammifères transgéniques non-humains est réalisée en utilisant des méthodes classiques et notamment selon les protocoles décrits dans Transgenic animals generation and use (C.M. Houdebine Ed., Harwood academic publishers, Amsterdam).

La présente invention a également pour objet un procédé de réduction d'un produit comprenant au moins deux cystéines à activité redox, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact de ladite protéine avec une sulfirédoxine (Srx), qui comprend au moins un site catalytique présentant le motif suivant : FXGCHR, avec X= G ou S, en présence d'ATP et de magnésium.

La réduction du produit comprenant au moins deux cystéines à activité redox implique son activation par phosphorylation suivie d'une réduction du soufre, ces deux activités étant catalysées par la sulfirédoxine.

La présente invention a également pour objet un procédé de synthèse d'un produit comprenant des résidus Cys-SH à partir de produits comportant des résidus Cys-SO₂H, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de réduction du produit comportant les résidus Cys-SO₂H en produit comprenant des résidus Cys-SH, en présence d'une sulfirédoxine, d'ATP et de magnésium.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la réaction catalysée par Srx1.

- les figures 2 et 3 représentent la comparaison des séquences de Srx1 dans différentes espèces ; figure 2 : *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *S. pombe*, *H. sapiens*, *M. musculus*, *D. melanogaster* et *A. thaliana* ; les régions identiques sont encadrées ; le site catalytique se trouve autour de la cystéine conservée, indiquée par un astérisque ; figure 3 : *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *M. musculus*, *D. melanogaster*, *A. thaliana*, *T. elongatus* et *Nostoc sp.*. Les n° d'accès GenBank sont indiqués sur cette figure. L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel CLUSTALW. Les acides aminés identiques dans environ 65 % des séquences sont encadrés. Le site actif Srx1 comprenant une cystéine (flèche noire) et les autres cystéines (flèche blanche) sont indiqués.

- la figure 4 illustre le recyclage de la forme cystéine-acide sulfinique de la Tsa1, dépendant de la Srx1 ; figures 4a et 4b : analyse PAGE 2D des formes réduite (SH) et oxydée (SO₂H) de la Tsa1 marquée à la ³⁵S-Met dans des cellules sauvages et des cellules Δ srx1 exposées au H₂O₂ (500 μ M) pendant la période indiquée ; les figures 4c et 4d correspondent à des Western blot de formes réduite (2xAMS) et oxydée (1xAMS) de Tsa1 à partir de cellules WT (c) ou de cellules Δ srx1 (d) traitées au H₂O₂ après alkylation *in vitro* avec de l'AMS. Après induction de l'expression de Srx1 pendant 15 min avec de l'H₂O₂ (100 μ M), les cellules sont

traitées avec de la cycloheximide (CHX) 5 min avant le traitement à l' H_2O_2 (500 μM).

- la figure 5 illustre le rôle joué par la protéine Srx1 dans la résistance des cellules au stress induit par du peroxyde d'hydrogène ; des tests de sensibilité sont réalisés en faisant croître une souche sauvage (WT) et une cellule invalidée (Δsrx1) ou une souche mutante $\text{srx1}^{\text{C84S}}$ dans des boîtes de Pétri contenant des concentrations croissantes (en mM) de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 5a et 5b) : figure 5a : résistance à H_2O_2 de la souche sauvage (WT), de la souche invalidée (Δsrx1) et de la souche mutante $\text{srx1}^{\text{C84S}}$; figure 5b : Western blot (incrustation) et QT-RT PCR de la protéine Srx1 étiquetée à HA et de l'ARNm dans des cellules traitées au peroxyde d'hydrogène (400 μM).

- la figure 6 illustre le rôle joué par la protéine Srx1 dans la résistance des cellules au stress induit par du t-butyl hydroperoxyde ; des tests de sensibilité sont réalisés en faisant croître une souche sauvage (WT), une cellule invalidée (Δsrx1), une souche sauvage surexprimant Tsa1 ou Srx1, une cellule invalidée (Δsrx1) exprimant Tsa1, une cellule invalidée (Δtsa1) et une cellule invalidée (Δtsa1) surexprimant Srx1 dans des boîtes de Pétri contenant des concentrations croissantes de t-butyl hydroperoxyde (tBOOH) ; les concentrations sont exprimées en mM.

- la figure 7 illustre l'interaction entre Tsa1 et Srx1 de façon covalente (pont disulfure) et non-covalente ; Figure 7a : Western blot de la protéine Srx1 étiquetée HA (pistes 1, 2 et 3) ou de la $\text{Srx1}^{\text{C84S}}$ étiquetée HA (piste 4) exprimées dans une souche sauvage (WT) (pistes 1, 2, 4) ou dans des cellules Δtsa1 (piste 3) traitées 15 min avec H_2O_2 (500 μM) après une électrophorèse SDS-PAGE réalisée en conditions réductrices (R) (piste 2) ou non réductrices (NR) (pistes 1, 3, 4) ; figure 7b : les protéines co-purifiées avec la Srx1 étiquetée avec la 6His (pistes 2,4) ou la Srx1 non étiquetée (pistes 1, 3) dans des conditions non-réductrices, sont séparées par SDS-PAGE dans des conditions non-réductrices (pistes 1, 2) ou réductrices (pistes 3, 4) et visualisées par coloration au bleu de Coomassie. Les bandes de protéines sont identifiées par spectrométrie de masses MALDI-TOF comme indiqué.

- la figure 8 montre que la protéine Srx1 et l'ATP sont nécessaires à la réduction de la Tsa1 oxydée *in vitro* par Srx1 ; figures 8 a et b : Analyse en Western blot des formes réduite (SH) et super-oxydée (SO_2H) de la Myc-Tsa1 dans des lysats

de cellules *Δtsa1* incubées 15 min à 30°C avec de la Srx1 purifiée et de l'ATP, aux concentrations indiquées ; figure 8c : Analyse en Western blot des formes réduite (SH) et super-oxydée (SO₂H) de la 6His-Tsa1 incubée pendant 15 min à 30°C avec de la Srx1 purifiée, de l'ATP (1 mM) et du Mg⁺⁺ (1 mM), comme indiqué.

5 - la figure 9 illustre le rôle de la hSrx1 dans la réduction des 6His-Prx1 et 6His-Prx2 dans leurs formes superoxydées.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

10 **Exemple 1 : Matériel et Méthodes.**

1.1. Souches

Les souches de *S. cerevisiae* utilisées sont la souche YPH98 (Sikorski R. et al., Genetics, 1989, 122, 19-27) (MATa, ura3-52, lys2-801^{ambre}, ade2-101^{ocre} trp1-Δ1 leu2-Δ1) et ses dérivés isogéniques. Les souches *Δsrx1*, *Δtrr1* et *Δtsa1* sont réalisées en remplaçant la région codante de SRX1 (sulfirédoxine) et de TRR1 (thiorédoxine réductase) par KANMX4 et le cadre ouvert de lecture TSA1 par TRP1 (tyrosinase-related protein 1).

20 Les souches surexprimant Tsa1 et Srx1 sont identiques aux précédentes, sauf qu'elles portent chacune une délétion du gène *Tsa1* ou *Srx1* et portent le plasmide à copies multiples psRS426 (n°ATCC 77107) ;

Les cellules sont cultivées à 30°C dans un milieu YPD (extrait de levure à 1 %, bactopectone à 2 % et glucose à 2 %) ou un milieu CASA (base azotée de levure à 0,67 %, casaminoacides à 0,1 %, glucose à 2 %), complémenté en adénine, tryptophane et uracile.

25 1.2. Plasmides

Les protéines de fusion suivantes :

- Srx1-HA : protéine de fusion comprenant la fusion de deux épitopes HA en C-terminal de Srx1 et
- 6His-Srx1 : protéine de fusion entre Srx1 et à son extrémité N-terminale six étiquettes histidine,

30 sont construites par PCR en deux étapes : les amorces nucléotidiques utilisées pour la PCR incorporent la séquence de l'un ou l'autre des épitopes

HA (défini par l'anticorps commercial reconnaissant l'épitope HA 12CA5, Babco, MMS-101 R) et 6His (6 histidines) et amplifient la séquence codante complète de Srx1, flanquée par 400 et 200 paires de bases en amont et en aval de leur séquence et cloné au site EcoRI du plasmide pRS316 (n°ATCC77145) ou du plasmide pRS426 (n°ATCC 77107).

Myc-Tsa1, une protéine de fusion comprenant à l'extrémité N-terminale de Tsa1, un épitope Myc (défini par l'anticorps anti-Myc, 9E10, Babco, MMS-150R) est construite et clonée de manière similaire au site EcoRI du plasmide pRS316. La mutagenèse dirigée pour la génération des mutants Cys>Ser est réalisée par un protocole standard d'amplification par PCR à l'aide d'oligonucléotides amorces comportant la séquence modifiée.

1.3. Analyse des protéines

* Pour l'analyse en PAGE 2D, les cultures cellulaires en début de phase exponentielle ($DO_{600nm}=0,3$) sont marquées avec de la ^{35}S -Met (100 μ Ci) 20 min à 30°C, suivie d'une chasse de la méthionine marquée par de la méthionine froide (1 mM final) et de la cystéine (0,1 mM final) et traitées avec de l' H_2O_2 (500 μ M). Les cellules sont soumises à une analyse PAGE 2D comme décrit dans Maillet et al. (J. Biol. Chem., 1996, 271, 10263-10270).

* Pour l'analyse de l'état redox *in vivo* de Srx1-HA, des lysats de cultures de cellules en début de phase exponentielle de culture ($DO_{600nm}=0,3$) sont préparés par le protocole de lyse à l'acide trichloroacétique (Delaunay et al., EMBO J., 2000, 19, 5157-5166). Les protéines précipitées sont solubilisées dans un tampon A [Tris-Cl, pH 8 (100 mM), SDS (1 %), EDTA (1 mM)] contenant du N-éthylmaleimide (NEM) (50 mM).

Les extraits sont séparés par SDS-PAGE à 17 % dans des conditions réductrices et non réductrices et la Srx1-HA est détectée par l'anticorps monoclonal 12CA5 précité.

* Pour la dérivation de la cystéine de Myc-Tsa1 par AMS, les extraits cellulaires sont traités dans les mêmes conditions que celles du protocole de lyse TCA, sauf que les protéines précipitées sont d'abord solubilisées dans le tampon A contenant du DTT (50 mM) pendant 1 h à 37°C, précipitée par le TCA mises en suspension dans un tampon A contenant de l'AMS (15 mM) pendant 2 h à 37°C. Les

extraits cellulaires sont séparés par SDS-PAGE à 20 % dans des conditions réductrices et Myc-Tsa1 est immunodéecté avec l'anticorps monoclonal anti-Myc 9E10, précité.

* Pour la réduction *in vitro*, soit 3 μ l de lysat (2 mg/ml) de cellules Δ srx1 traitées à l' H_2O_2 comprenant de la Myc-Tsa1 oxydée, soit de la 6His-Tsa1 oxydée et purifiée (0,5 mg) sont ajoutés dans le tampon de réaction (RM) (80 μ l final) [Tris-Cl pH 6,8 (50 mM), KCl (100 mM)] contenant de la Srx1 purifiée exprimée par un baculovirus, de l'ATP et du $MgCl_2$ aux concentrations indiquées et incubés 15 min à 30°C. La 6His-Tsa1 est oxydée en cystéine-acide sulfinique par incubation dans le tampon RM contenant du DTT (10 mM) et de l' H_2O_2 (1 mM) pendant 30 min et diluée 16 fois de le milieu réactionnel.

1.4. Purification des protéines recombinantes

. La Srx1 et la hSrx1 sont exprimées dans des cellules d'insecte High Five en utilisant le système d'expression en baculovirus Bac-To-Bac[®] (Invitrogen) et purifiées successivement par chromatographe d'échanges d'ion, chromatographie d'affinité et HPLC (8ml-Poros[®] 50HS, 8ml-Poros[®] 50HE, 0,8ml-Poros[®] 20HS) (Applied Biosystems).

. La 6His-Tsa1 est exprimée dans des cellules *E. coli* BL21 à partir du plasmide pET28a-Tsa1 après induction à l'isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside, conformément aux recommandations du fabricant (Stratagène). Les cellules sont mises en suspension dans un tampon de lyse [Tris-Cl pH 6,8 (50 mM), KCl (100 mM), DTT (2 mM), imidazole (20 mM)], supplémenté en fluorure de phénylméthane-sulfonyl (PMSF) (1 mM), lysées par des cycles congélation-décongélation et sonication. Les extraits sont centrifugés 30 min à 30.000 g et le surnageant est passé dans une colonne d'agarose Ni-NTA (Qiagen). Après lavage de la colonne avec le tampon de lyse, la Tsa1 est éluee par du tampon de lyse supplémenté en imidazole (150 mM).

La pureté et la concentration des protéines purifiées est déterminée par coloration au bleu de Coomassie après SDS-PAGE et test Bradford (Biorad).

1.5. Purification des partenaires de réaction de la Srx1

La 6His-Srx1 et la Srx1 sont exprimées à partir du plasmide pRS426 dans la souche Δ trr1, dépourvue du gène de la thiorédoxine réductase qui stabilise les ponts disulfures. Les cellules sont cultivées jusqu'au milieu de la phase exponentielle ($DO_{600nm} = 0,8$) et traitées par H_2O_2 (5 mM) pendant 5 min, lavées deux fois dans de

l'eau supplémentée en NEM (10 mM), congelées et lysées dans une presse Eaton dans un tampon C [Tris-Cl pH 8 (100 mM), NaCl (50 mM) EDTA-sans inhibiteur de protéase (Roche-Boehringer), PSMF (1 mM), imidazole (20 mM), NEM (10 mM)]. L'extrait cellulaire est centrifugé 1h30 à 10.000 g et le surnageant est passé dans une
5 colonne Ni-NTA (Qiagen). Après lavage, de la colonne avec un tampon D [Tris-Cl pH 8 (100 mM), NaCl (50 mM)] + imidazole (20 mM), les protéines sont éluées avec le tampon D + imidazole (300 mM).

1.6. Analyse de l'ARN

L'ARN total est extrait comme décrit dans Lee et al. (J. Biol. Chem.,
10 1999, 274,4537-4544) et l'ADNc est synthétisé par transcription inverse avec des amorces aléatoires hexanucléotidiques, à partir d'1 µg d'ARN total.

Une PCR quantitative (Biorad iCycler) est réalisée en utilisant la méthode au SYBR Green I fluorescent, avec les amorces spécifiques de SRX1 ou ACT1, trois fois séparément, conformément aux recommandations du fournisseur.

15 Exemple 2 : Réversibilité de la sur-oxydation de la cystéine de la Tsa1 par l'activité catalytique de la Srx1.

2.1 Matériel et méthodes

L'une des 5 Prxs de *S. cerevisiae*, la Tsa1, est une 2-Cys Prx et constitue l'antioxydant principal chez la levure avec une spécificité de substrat large
20 envers à la fois H₂O₂ et les peroxydes organiques.

L'oxydation de Tsa1 et la réversibilité de cette réaction en présence de Srx ont été analysées selon deux techniques :

(A) séparation selon le point isoélectrique de la protéine en gel à deux dimensions (électrophorèse PAGE en 2D) ; les cellules de souche sauvage (WT)
25 et la souche invalidée *Δsrx1* sont initialement soumises à un marquage radioactif *in vivo* des protéines suivie d'une chasse de l'élément radioactif avant d'être traitées au H₂O₂, pendant des durées différentes (0, 2, 30 et 90 minutes de traitement) ; la tâche de gauche (figure 4a) représente la forme native de la protéine et la tâche de droite (figure 4a) la forme acide (acide sulfinique).

30 (B) alkylation différentielle des thiols ; les cellules de souche sauvage (WT) et souche invalidée *Δsrx1* portant une copie étiquetée de Tsa1 sont traitées à la cycloheximide (CHX) pour bloquer la synthèse protéique *de novo* en

cours d'analyse, puis traitées à l' H_2O_2 . Les protéines sont extraites, réduites au DTT puis les thiols sont alkylés par un composé de 500Da, l'acide 4-acétamido-4'-maléimidylstilbène-2,2'-disulfonique (AMS) qui alkyle les cystéines au niveau des groupes SH libres mais pas sous forme de sulfinate, augmentant le poids moléculaire de la protéine de 0,5 kDa par cystéine alkylée (AMS) ; la différence de taille entre les protéines portant deux thiols alkylés (cystéines réduites ou pont disulfure, indiqué « 2 AMS » sur les figures 4c et 4d ou un thiol alkylé (acide sulfinique, indiqué « 1 AMS » sur les figures 4c et 4d) est observée après séparation selon leur taille sur un gel SDS-PAGE. La protéine est révélée par Western Blot ;

10 2.2 Résultats

Les résultats sont présentés aux figures 4a et 4b.

Dans les extraits cellulaires non-traités, Tsa1 apparaît comme une tache double : l'une intense correspondant à environ 85% de l'enzyme totale à une position de pI de 4,8 (+/- 0,05), ce qui correspond à une Tsa1 réduite (le pI théorique de la Tsa est 4,87) ; l'autre tache plus fine se situant à une position de pI plus acide de 4,7 (+/- 0,05), ce qui correspond à la Tsa1 oxydée (la valeur théorique de la forme acide sulfinique de la cystéine de la Tsa1 est 4,75). Après deux minutes de traitement par H_2O_2 (500 μM), la proportion de Tsa1 oxydée augmente au détriment de la Tsa1 réduite, et ce jusqu'à une proportion d'environ 90% des protéines totales. Après 30 minutes de traitement, le rapport Tsa1 réduit/oxydé revient à celui des cellules non-traitées. La réapparition de la tâche de Tsa1 réduite provient de la Tsa1 oxydée et non de Tsa1 synthétisée *de novo*, étant donné que le marquage de protéines est interrompu avant l'analyse. Des résultats identiques sont observés lorsque les cellules sont traitées avec du t-butyl hydroperoxyde (t-BOOH).

25 Dans les extraits cellulaires non-traités par l' H_2O_2 , la Tsa1 est en grande partie réduite et migre comme une bande double modifiée par l'AMS (Figures 4c et 4d) ; et 15 minutes après traitement par H_2O_2 , la Tsa1 migre comme des espèces singulières ou doubles modifiées par l'AMS, présentant un mélange de formes réduite et oxydée selon un rapport d'environ 1:3. Après une durée de 120 minutes de ce traitement, la Tsa1 est complètement revenue à son état initial, c'est à dire sous forme de doublet alkylé par l'AMS, mettant en évidence la réduction du sulfinate en Cys-SH. La réduction de la Tsa1 est différée comparativement à celle observée par 2D-

PAGE (Figure 4a), ce qui est probablement dû à l'inhibition de la synthèse de protéines.

Ces deux expériences montrent que la forme sur-oxydée de Tsa1 (acide sulfinique) est réductible en thiol libre dans une souche sauvage et que la présence de Srx1 est indispensable à cette réduction.

Exemple 3 : Identification d'une protéine de 13 kDa chez *S. cerevisiae* liée à une Prx par pont disulfure (figure 7).

3.1 Matériel et Méthodes (voir exemple 1)

(A) Des cellules contenant une copie étiquetée (HA) de la protéine Srx1 sont traitées par 500 μ M d' H_2O_2 pendant 15 minutes. Les protéines sont extraites selon une méthode permettant la conservation de l'état redox intracellulaire des thiols (voir exemple 1) puis séparées sur gel SDS-PAGE en conditions réductrices pour les cellules de la souche sauvage (WT) contenant une copie étiquetée (HA) de la protéine Srx1 (piste 1) et en conditions non-réductrices pour les cellules de souche sauvage (WT) (piste 2), la souche mutante $\Delta tsa1$ portant une copie étiquetée du gène *SRX1* (piste 3), et la souche $\Delta srx1$ portant une copie étiquetée du gène *SRX1* ayant subi une mutation C84S (piste 4) ; les poids moléculaires de références (MW) sont exprimés en kDa.

(B) la protéine Srx1 est purifiée dans les conditions natives grâce à une étiquette 6His, à partir de cellules $\Delta trr1$ traitées pendant 5 minutes avec 5 mM de H_2O_2 ; les protéines purifiées sont ensuite séparées sur gel SDS-PAGE réducteur ou non-réducteur. L'identification des différentes protéines indiquées a été réalisée par spectrométrie de masse ; les protéines purifiées séparées dans des conditions non-réductrices et réductrices proviennent de la souche mutante $\Delta trr1$ contenant une copie du gène *SRX1* (puits n°1 et 3), et de la souche mutante $\Delta trr1$ contenant une copie étiquetée (HA) du gène *SRX1* (puits n°2 et 4), les poids moléculaires de références (MW) sont exprimés en kDa.

3.2 Résultats

La figure 7a met en évidence l'existence d'un pont disulfure inter-moléculaire entre Tsa1 et Srx1, impliquant la cystéine conservée (Cys84) de Srx1 (voir figures 2 et 3).

Elle montre en outre que Srx1 peut se trouver sous deux formes : un monomère de 13 kDa et un multimère de 55 kDa lié par pont disulfure (Figure 7a, piste 2).

La figure 7b illustre le fait que la copurification des Tsa1, Tsa2 et Ahp1 montre que Srx1 interagit avec trois des cinq peroxyrédoxines existant chez la levure et que l'interaction avec Tsa1 peut être redox ou non covalente.

De manière plus précise, le matériau non-réduit purifié contient plusieurs bandes majeures de tailles de 80, 55, 40, 35, 20 et 13 kDa (Figure 7b) qui se limitent à 2 bandes principales de 13 et 20 kDa et une bande mineure de 18 kDa après réduction (dernier puits). La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF appliqué sur le matériau réduit a permis d'identifier les protéines Srx1, Tsa1 et la protéine Ahp1 qui est la seconde 2-Cys Prx majeure de levure, dans les bandes respectivement de 13, 20 et 18 kDa. La Tsa2, qui est une troisième 2-Cys Prx, est aussi présente sous forme de traces dans la bande de 20 kDa. L'analyse par spectrométrie de masse de lysat non-réduit a permis d'identifier à la fois la protéine Tsa1 et la protéine Srx1 dans la bande de 55 kDa, probablement sous forme d'hétérotrimères liés par pont disulfure contenant 2 molécules de Tsa1. Cette analyse a permis également de détecter la présence de la protéine Tsa1 dans les bandes de 40, 35 et 20 kDa, probablement sous forme de dimères et de monomères liés par pont disulfure. L'association des protéines Srx1 et Tsa1, qui sont liées par pont disulfure, est confirmée par immunodétection au cours de laquelle la bande de 55 kDa contenant la protéine Srx1 n'est pas détectée dans les lysats traités par H₂O₂ provenant de la souche $\Delta tsa1$ dépourvue du gène *TSA1*. Ces résultats montrent que la Srx1 est fortement induite par H₂O₂ et s'associe avec la Tsa1 de façon non-covalente sous forme d'hétéromères liés par pont disulfure.

La protéine Srx1 s'associe aussi avec 2 autres Prx : Ahp1 et Tsa2, mais son association est mineure dans les conditions testées.

Exemple 4 : La fonction Srx1 est liée à l'activité peroxydase et à Tsa1.

4.1. Matériel et Méthodes

4.1.1 Matériel

La souche sauvage et les deux souches mutantes $\Delta tsa1$ et $\Delta srx1$ sont celles déjà décrites à l'Exemple 1.

4.1.2 Méthodes

Les tests de sensibilité des souches sauvage et mutantes au t-BOOH et au H₂O₂ sont effectués comme suit (voir également exemple 1) :

- Test de sensibilité au tBOOH ou à l'H₂O₂

5 Des cellules sauvages ou invalidées pour le gène SRX1 sont déposées sur des boîtes de Pétri contenant des concentrations croissantes de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou de t-butyl hydroperoxyde (tBOOH). La croissance des cellules est observée après 48 heures d'incubation à 30°C.

- Extraction des protéines tout en préservant leur état redox
10 cellulaire (voir exemple 1).

4.2. Résultats

Les Figures 5a et 5b montrent que la souche invalidée pour le gène SRX1 présente une hypersensibilité au peroxyde.

La figure 6 montre également que la protéine Srx1 est nécessaire à la
15 résistance contre le stress au peroxyde.

En particulier, cette figure 6 montre que la surexpression de TSA1 corrige totalement le défaut de résistance de la souche Δ srx1 montrant que cette sensibilité est due à un défaut d'activité peroxydase. La surexpression de SRX1 dans une levure Δ tsa1 n'a aucun effet, contrairement à la même surexpression dans une souche
20 sauvage. Ceci montre que la présence de Tsa1 est indispensable à la fonction de Srx1.

La fonction du gène *SRX1* est liée au gène *TSA1*. La surexpression de *TSA1* restaure le défaut de tolérance au H₂O₂ et au t-BOOH dans la souche Δ tsa1, mais la surexpression du gène *SRX1* ne provoque aucun effet de ce genre dans la souche Δ tsa1, bien qu'elle augmente légèrement la tolérance de la souche sauvage au
25 t-BOOH. Ces données indiquent que Srx1 agit par l'intermédiaire de Tsa1, alors que la surexpression de Tsa1 peut compenser un défaut en protéine Srx1.

La substitution en sérine de Cys84 (Srx1^{Cys84S}) supprime complètement la fonction de la Srx1 dans la tolérance au peroxyde d'hydrogène (Figure 5a) et la formation de pont disulfure Srx1-Tsa1, indiquant que cette liaison est essentielle
30 pour la fonction de Srx1 et est due à la Cys84.

Exemple 5 : L'ATP est nécessaire pour réduire la forme Cys-SO₂H de la Tsa1.**5.1 Matériel et Méthodes**

Voir Exemple 1.

5.2 Résultats

5 Afin d'étudier plus en détails la réduction de la forme Cys-SO₂H de la Tsa1 par Srx1, la protéine Srx1 recombinante exprimée par baculovirus a été produite. Elle montre que la Srx1 purifiée permet la réduction de la forme SO₂H de la Tsa1 purifiée, et que cette réduction se produit seulement en présence d'ATP et de lysats provenant de cellules de type sauvage (Figure 8). Ces données montrent que
10 Srx1 catalyse la réduction de la forme sulfinate de la Tsa1.

 En effet, la protéine Srx1 permet la réduction de la forme Cys-SO₂H de la protéine Tsa1 présente dans les lysats des cellules Δ Srx1 traitées à H₂O₂ selon une manière dose-dépendante, seulement lorsque l'ATP est ajouté (Figure 8a et b). Le GTP et l'AMP-PNP, qui est un homologue de l'ATP non-hydrolysable, n'a aucun
15 effet sur la catalyse. L'ajout d'EDTA au lysat inhibe la réduction de la Tsa1 Srx1-dépendante et la réintroduction de Mg⁺⁺ ou de Mn⁺⁺ mais pas de Fe⁺⁺, Ca⁺⁺, Cu⁺⁺, ou Zn⁺⁺, restaure la réduction. Finalement, la Srx1 purifiée réduit complètement la forme Tsa1 purifiée et oxydée *in vitro* en présence d'ATP, de Mg⁺⁺ ou de Mn⁺⁺ et de DTT (Figure 8c), démontrant que la Srx1 elle-même catalyse la réduction de la forme Cys-
20 SO₂ en la forme Cys-SH. Le couplage d'hydrolyse de l'ATP et le besoin spécifique en Mg⁺⁺ ou Mn⁺⁺ suggèrent fortement que la phosphorylation du substrat est réalisée par la Srx1, comme étant une étape dans le processus réducteur de Cys-SO₂H, bien qu'un intermédiaire n'ait pas encore été détecté, probablement à cause de la nature hautement instable de celui-ci. La liaison disulfure entre Srx1 et Tsa1 suggère aussi qu'un
25 mécanisme fonctionnant à base de groupe thiol existe comme étant une autre étape dans ce processus. L'activité des mutants Srx1 a été testée par la substitution de chacune de ses 3 cystéines. La substitution de la Cys84 (Srx1^{Cys84S}), qui est conservée parmi les homologues de la Srx1 chez d'autres eukaryotes supprime totalement la formation du pont disulfure entre Srx1 et Tsa1 et la réduction de la forme Cys-SO₂H
30 de la Tsa1, alors que les autres mutants cystéine ne présentent aucun effet pour la Srx1^{Cys106S} ou un effet mineur pour la Srx1^{Cys48S}. Ces données indiquent que la liaison Srx1-Tsa1 provient de Cys84 de la Srx1 et qu'elle est essentielle pour la réduction de

la Tsa Cys-SO₂H médiée par la Srx1. La substitution de la Cys84 en sérine supprime aussi le rôle de la Srx1 *in vivo* dans la tolérance au peroxyde d'hydrogène, indiquant de plus que la réduction Srx1-dépendante de la Tsa1 Cys-SO₂H est importante pour que la peroxydase fonctionne.

- 5 L'acide sulfinique des cystéines dans les protéines ne peut pas être réduit par des réducteurs mono- ou dithiol.

Le mécanisme d'action suivant est proposé :

- La sulfirédoxine catalyse cette réduction selon un processus à multi-étapes en agissant à la fois comme une phosphotransférase spécifique et comme une thioltransférase (Figure 8). La réduction de l'acide sulfinique de la cystéine nécessite vraisemblablement son activation initiale, qui peut être réalisée par formation d'un ester sulfinique phosphorylé, comme le besoin en ATP et en Mg⁺⁺ l'indique. Cette modification permet l'attaque du résidu sulfure par la cystéine au site activé de la Srx1, puis la formation temporaire d'un thiolsulfinate intermoléculaire entre Srx1 et Tsa1. Le thiolsulfinate existe au cours du stress oxydatif et est accessible à la réduction thiol-dépendante. Ainsi, une fois formé, le thiolsulfinate entre Srx1 et Tsa1 est converti en deux Cys-SH par des échanges thiol-rédox successifs impliquant initialement le clivage réducteur du pont thiolsulfinate en un sulfénate et en un pont disulfure grâce aux électrons fournis par le DTT *in vitro* et probablement par la thiorédoxine *in vivo*.
- 10
15
20

Exemple 6 : Identification de la sulfirédoxine humaine (hSrx1) et mise en évidence de son activité catalytique.

6.1. Matériel et méthodes

- Le gène hSrx (SEQ ID NO :4) a été cloné par PCR à partir d'ADNc préparés par rétrotranscription à partir de cellules d'une lignée humaine tumorale MCF-7, en utilisant les oligonucléotides :
- 25

TTAATTGAATTCATGGGGCTGCGTG CAGGAGG (SEQ ID NO :13) et

TTTTCCTTTTGC GGCCGCCTACTACTGCAAGTCTGGTGTGGATG (SEQ ID NO :14)

- 30 La séquence codante hSrx1 a été clonée dans le vecteur pFastBac1 (Invitrogen) puis exprimée dans des cellules d'insecte High Five (voir exemple 1, point 1.4).

Le lysat des cellules High Five surexprimant hSrx1 a été utilisé *in vitro* pour tester son activité de réduction des peroxyrédoxines humaines Prx1 et Prx2 suroxydées dans la forme acide sulfinique (Figure 9). 6HIS-Prx1 et 6HIS-Prx2 ont été exprimés, purifiés et suroxydés selon la même méthode que la Tsa1 de chez *S. cerevisiae*. Le protocole et la méthode sont identiques à ceux de l'exemple 1 (points 1.3 et 1.4).

6.2. Résultats

La figure 9 illustre les résultats obtenus et montre la capacité de la hSrx1, exprimée à partir du Baculovirus dans les cellules High Five, à réduire les peroxyrédoxines humaines 6His-Prx1 et 6His-Prx2 suroxydées dans la forme cystéine acide sulfinique.. Cette réduction nécessite la présence des cofacteurs ATP (1 mM) et Mg++ (1 mM) et le dithiotreitol (2 mM).

Les extraits de Baculovirus expriment soit hSrx1 (h Srx), soit la protéine Tau138 (control). La méthode et le protocole de cette expérience sont identiques à ceux précisés à l'exemple 5.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'une protéine dénommée sulfirédoxine (Srx), qui comprend au moins un site catalytique présentant le motif suivant : FXGCHR, avec X= G ou S, pour catalyser la réduction des peroxyrédoxines (Prxs) sous leur forme super-oxydée Prx-Cys_{sp}-SO₂H (peroxyrédoxine cystéine acide sulfinique) en dérivé thiol (SH).

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite sulfirédoxine est une sulfirédoxine de microorganisme, de plante ou d'organisme supérieur, qui comprend généralement entre 80 et 170 acides aminés et au moins le site catalytique présentant le motif suivant : FXGCHR, avec X= G ou S ainsi que les pourcentages d'identité et de similarité suivants :

. levure/homme : 31 % d'identité et 67 % de similarité

. levure/plantes : 23 % d'identité et 39 % de similarité

. levure/souris : 31 % d'identité et 51 % de similarité

. levure/champignons : 80 % d'identité et 90 % de similarité.

3°) Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ladite sulfirédoxine est notamment sélectionnée parmi les protéines dont les séquences correspondent respectivement aux séquences SEQ ID NO : 1 à 10.

4°) Peptide isolé, correspondant au site catalytique de la Srx, telle que définie aux revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est défini par la séquence suivante : FXGCHR, avec X= S.

5°) Médicament, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace d'une protéine définie par une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 1-3 et 5-10 et éventuellement au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

6°) Utilisation d'une protéine telle que définie aux revendications 1 à 3, pour la préparation d'un médicament antioxydant destiné à traiter les cancers, les troubles neurodégénératifs et les maladies neuromusculaires, dans lesquels l'on observe une défaillance du système antioxydant Prx/Srx.

7°) Procédé de dépistage de maladies liées au cancer, au vieillissement, aux maladies neurodégénératives et aux maladies neuromusculaires, lequel

procédé est caractérisé en ce qu'il comprend, pour évaluer l'implication du système antioxydant Prx/Srx :

(1) la mise en contact *in vitro* des cellules d'un échantillon biologique avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

(2) la détection de la Prx-Cysp-SO₂H formée, entre 1 heure et 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (1), et

(3) l'établissement du rapport des quantités de Prx-Cysp-SO₂H et de Prx-Cysp-SH, à partir de 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (1).

8°) Procédé de dépistage de maladies liées au cancer, au vieillissement, aux maladies neurodégénératives et des maladies neuromusculaires, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend le génotypage de la sulfirédoxine, à partir de l'ARN total d'un échantillon biologique convenable, notamment des cellules sanguines, conformément aux étapes suivantes :

(1) l'extraction de l'ARN total, à partir dudit échantillon biologique,

(2) la préparation d'ADNc spécifique de la sulfirédoxine, par amplification de l'ARN à l'aide des deux amorces suivantes :

GTCCCGCGGCGGCGGCGACG (SEQ ID NO :11)

AGCAGGTGCCAAGGAGGCTG (SEQ ID NO :12),

ces séquences étant situées respectivement en amont et en aval de l'ORF de la sulfirédoxine humaine (GenBank n° AAH47707),

(3) l'établissement de sa séquence nucléotidique et

(4) la comparaison par rapport à une séquence d'ADN codant pour une protéine Srx, telle que définie ci-dessus, issue de la même espèce que celle de l'échantillon biologique à analyser.

9°) Procédé de dépistage de maladies liées au cancer, au vieillissement, aux maladies neurodégénératives et aux maladies neuromusculaires, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la quantification relative, par tout moyen approprié, de l'ARNm codant pour la sulfirédoxine humaine à partir des ADNc totaux préparés à partir d'un échantillon biologique humain, par comparaison avec un échantillon de référence.

10°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite quantification comprend :

(a1) la préparation d'ADNc à partir de l'ARN total par transcription inverse avec des amorces appropriées et notamment des amorces aléatoires hexanucléotidiques ;

5 (a2) l'amplification dudit ADNc en présence de la paire d'amorces :
GTCCCGCGGCGGCGGCGACG (SEQ ID NO :11)
AGCAGGTGCCAAGGAGGCTG (SEQ ID NO :12),
en présence d'un reporter fluorescent et de façon simultanée ou séquentielle,

10 (a3) la détection de la quantité de l'amplimère (ou amplicon) par mesure du signal fluorescent.

11°) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le reporter fluorescent est sélectionné dans le groupe constitué par des agents se liant à l'ADN double-brin et des sondes fluorescentes.

12°) Procédé selon la revendication 10 ou la revendication 11, caractérisé en ce que lorsque ledit reporter fluorescent est une sonde, il est de préférence sélectionné dans le groupe constitué par les sondes définies par les séquences suivantes :

15 TTAATTGAATTCATGGGGCTGCGTGCAGGAGG (SEQ ID NO :13) et
TTTTCCTTTTGCGGCCGCCTACTACTGCAAGTCTGGTGTGGATG (SEQ ID
20 NO :14).

13°) Procédé de dépistage de maladies liées au cancer, au vieillissement, aux maladies neurodégénératives et aux maladies neuromusculaires, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

25 - l'immunodétection de la protéine Srx dans un échantillon biologique à tester, à l'aide d'un anticorps obtenu par immunisation convenable d'un animal avec une protéine Srx ou le peptide FXGCHR, avec X=G ou S, après séparation des protéines totales par électrophorèse, puis

- l'évaluation de la qualité et de la quantité de ladite protéine Srx par rapport à une protéine Srx contrôle.

30 14°) Utilisation de la séquence codant pour une protéine Srx, telle que définie aux revendications 1 à 3, pour l'obtention de plantes dont les capacités de résistance au stress sont significativement augmentées.

15°) Cellules hôtes, caractérisées en ce qu'elles sont transformées par un vecteur recombinant contenant une séquence codant pour une protéine Srx, définie par une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :1-3, 5, 6 et 8-10.

5 16°) Cellule hôte selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de *S. cerevisiae* modifiée par un vecteur surexprimant le gène *SRX1*.

10 17°) Cellule hôte selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une cellule de mammifère modifiée par un vecteur surexprimant le gène hSrx1.

18°) Cellule hôte selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, caractérisée en ce que ledit vecteur est avantageusement un vecteur navette *E. coli/S. cerevisiae* comprenant au niveau d'un site de clonage EcoRI, la séquence codant pour la protéine Srx et le promoteur du gène *Srx*.

15 19°) Procédé de criblage de médicaments aptes à moduler l'activité du système antioxydant Prx/Srx, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) la mise en contact de la substance à cribler avec des cellules hôtes selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, en présence de peroxyde d'hydrogène

20 (2) la détection de la Prx-Cys_{sp}-SO₂H formée, entre 1 heure et 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (1),

(3) l'établissement du rapport des quantités de Prx-Cys_{sp}-SO₂H et de Prx-Cys_{sp}-SH, à partir de 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (1).

25 20°) Procédé de criblage de médicaments utiles dans le traitement des cancers, des maladies neurodégénératives et des maladies neuromusculaires, liés à une défaillance du système antioxydant Prx/Srx, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) la mise en contact de la substance à tester avec un extrait de cellules hôtes selon l'une quelconque des revendications 15 à 18 ou un échantillon biologique d'un animal transgénique non humain, notamment des souris, sélectionné
30 dans le groupe constitué par des animaux dans lesquels le gène de la protéine Srx est invalidé et des animaux dans lesquels le gène de la protéine Srx est surexprimé, en présence de peroxyde d'hydrogène,

b) la mesure par tout moyen approprié, de l'activité antioxydante du système Prx/Srx du mélange obtenu en a), et

c) la sélection des substances capables de stimuler ou d'inhiber ladite activité.

5 21°) Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que la mesure de ladite activité est notamment effectuée par la détection de la Prx-Cysp-SO₂H formée, entre 1 heure et 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (a) et l'établissement du rapport des quantités de Prx-Cysp-SO₂H et de Prx-Cysp-SH, à partir de 4 heures après ladite mise en contact selon l'étape (a).

10 22°) Procédé de criblage de médicaments utiles dans le traitement des cancers, des maladies neurodégénératives et des maladies neuromusculaires, liés à une défaillance du système antioxydant Prx/Srx, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) la mise en contact de la substance à cribler avec des mammifères transgéniques non-humains, notamment des souris, sélectionné dans le groupe consti-
15 tué par des animaux dans lesquels le gène de la protéine Srx est invalidé et des animaux dans lesquels le gène de protéine Srx est surexprimé, et

(2) la mesure de la survie de l'animal.

20 23°) Anticorps anti-Srx, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par immunisation convenable d'un animal avec une protéine Srx, définie par une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :1-3, 5, 6 et 8-10 ou le peptide FXGCHR, avec X = S selon la revendication 4.

25 24°) Procédé de réduction d'un produit comprenant au moins deux cystéines à activité redox, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact de ladite protéine avec une sulfirédoxine (Srx), telle que définie aux revendications 1 à 3, qui comprend au moins un site catalytique présentant le motif suivant : FXGCHR, avec X= G ou S, en présence d'ATP et de magnésium.

30 25°) Procédé de synthèse d'un produit comprenant des résidus Cys-SH à partir de produits comportant des résidus Cys-SO₂H, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de réduction du produit comportant les résidus Cys-SO₂H en produit comprenant des résidus Cys-SH, en présence d'une sulfirédoxine telle que définie aux revendications 1 à 3, d'ATP et de magnésium.

0263-100-SEQ.ST 4
 SEQUENCE LISTING

1AP20 Rec'd PCT/PTO 04 JAN 2006

<110> COMMISARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA)

TOLEDANO, Michel

BITEAU, Benoît

<120> APPLICATIONS D'UNE NOUVELLE CLASSE D'ENZYMES: LES SULFIREDOXINES

<130> F263/100PCT

<150> FR 03/08212

<151> 2003-07-04

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 127

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

Met Ser Leu Gln Ser Asn Ser Val Lys Pro Thr Glu Ile Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Ile Arg Arg Pro Leu Ala Pro Val Leu Asp Pro Gln Lys Ile Asp
 20 25 30

Ala Met Val Ala Thr Met Lys Gly Ile Pro Thr Ala Ser Lys Thr Cys
 35 40 45

Ser Leu Glu Gln Ala Glu Ala Ala Ser Ala Gly Glu Leu Pro Pro
 50 55 60

Val Asp Val Leu Gly Val Arg Val Lys Gly Gln Thr Leu Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Phe Gly Gly Cys His Arg Leu Gln Ala Tyr Asp Arg Arg Ala Arg Glu
 85 90 95

0263-100-SEQ.ST25

Thr Gln Asn Ala Ala Phe Pro Val Arg Cys Arg Val Leu Pro Ala Thr
 100 105 110

Pro Arg Gln Ile Arg Met Tyr Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Glu
 115 120 125

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 2

Met Ser Met Tyr Thr Ser Arg Leu Ala Thr Glu Tyr Val Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Ile Lys Arg Pro Ile Pro Pro Val Leu Asp Tyr Gln Lys Ile Asp
 20 25 30

Ala Met Leu Ser Thr Leu Lys Gly Val Pro Met Glu Ser Ala Thr Cys
 35 40 45

Lys Val Glu Asp Ile Thr Ala Gly Glu Leu Pro Pro Ile Asp Val Phe
 50 55 60

Lys Ile Arg Glu Asn Gly Lys Asn Phe Tyr Phe Ala Phe Gly Gly Cys
 65 70 75 80

His Arg Phe Gln Ala Tyr Asp Arg Ile Ser Lys Glu Thr Glu Lys Glu
 85 90 95

Val Met Val Lys Ser Arg Ile Leu Pro Ala Thr Arg Lys Ser Leu Arg
 100 105 110

Ile Tyr Leu Gly Ala Ser Val Asp
 115 120

<210> 3

<211> 124

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 3

Met Thr Ser Ile His Thr Gly Ser Asn Asn Asn Ile Val Glu Leu Asp
 1 5 10 15

0263-100-SEQ.ST25

Met Ser Glu Leu Ile Arg Pro Ile Pro Pro Val Leu Asp Met Asn Lys
 20 25 30

Val Asn Ser Met Met Glu Thr Met Thr Gly Lys Thr Pro Pro Ala Ser
 35 40 45

Cys Gly Leu Thr Ser Glu Asp Leu Glu Ala Gly Glu Leu Pro Pro Val
 50 55 60

Asp Val Leu Thr Phe Lys Lys Ser Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Ala Phe
 65 70 75 80

Gly Gly Cys His Arg Leu Arg Ala His Asp Glu Ala Gly Arg Lys Lys
 85 90 95

Val Arg Cys Lys Leu Val Asn Cys Ser Pro Asn Thr Leu Arg Leu Tyr
 100 105 110

Leu Gly Ala Ser Ala Asn Lys Phe Leu Asp Ser Asp
 115 120

<210> 4

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Leu Arg Ala Gly Gly Thr Leu Gly Arg Ala Gly Ala Gly Arg
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Glu Gly Pro Gly Pro Ser Gly Gly Ala Gln Gly Gly Ser
 20 25 30

Ile His Ser Gly Arg Ile Ala Ala Val His Asn Val Pro Leu Ser Val
 35 40 45

Leu Ile Arg Pro Leu Pro Ser Val Leu Asp Pro Ala Lys Val Gln Ser
 50 55 60

Leu Val Asp Thr Ile Arg Glu Asp Pro Asp Ser Val Pro Pro Ile Asp
 65 70 75 80

Val Leu Trp Ile Lys Gly Ala Gln Gly Gly Asp Tyr Phe Tyr Ser Phe
 85 90 95

Gly Gly Cys His Arg Tyr Ala Ala Tyr Gln Gln Leu Gln Arg Glu Thr
 100 105 110

0263-100-SEQ.ST25

Ile Pro Ala Lys Leu Val Gln Ser Thr Leu Ser Asp Leu Arg Val Tyr
 115 120 125

Leu Gly Ala Ser Thr Pro Asp Leu Gln
 130 135

<210> 5

<211> 136

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Gly Leu Arg Ala Gly Gly Ala Leu Arg Arg Ala Gly Ala Gly Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Val Val His Gly Pro Gly Gly Ala Gln Gly Gly Ser Ile
 20 25 30

His Ser Gly Cys Ile Ala Thr Val His Asn Val Pro Ile Ala Val Leu
 35 40 45

Ile Arg Pro Leu Pro Ser Val Leu Asp Pro Ala Lys Val Gln Ser Leu
 50 55 60

Val Asp Thr Ile Leu Ala Asp Pro Asp Ser Val Pro Pro Ile Asp Val
 65 70 75 80

Leu Trp Ile Lys Gly Ala Gln Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Ser phe Gly
 85 90 95

Gly Cys His Arg Tyr Ala Ala Tyr Gln Gln Leu Gln Arg Glu Thr Ile
 100 105 110

Pro Ala Lys Leu Val Arg Ser Thr Leu Ser Asp Leu Arg Met Tyr Leu
 115 120 125

Gly Ala Ser Thr Pro Asp Leu Gln
 130 135

<210> 6

<211> 162

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

0263-100-SEQ.ST25

<400> 6

Met Glu Phe Ile Ser His Phe Leu Arg Ala Thr Ser Arg Arg Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Pro Ile Leu Gln Arg Asn Arg Ser Glu Ile Ile Gln Lys
 20 25 30

Gln Ser Leu Thr Asn Arg Gln Ala Phe Arg Arg Tyr Arg Ser Ser Cys
 35 40 45

Ser Thr Met Asp Thr Thr Val His Ser Ala Gly Ile Asp Glu Thr His
 50 55 60

Leu Val Pro Met Ser Val Ile Gln Arg Pro Ile Pro Ser Val Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Gln Lys Val Gln Ser Leu Met Glu Thr Ile Lys Asn Glu Thr Ser
 85 90 95

Glu Asp Glu Val Pro Pro Ile Asp Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ser Glu
 100 105 110

Gly Gly Asp Tyr Tyr Phe Ser Phe Gly Gly Cys His Arg Phe Glu Ala
 115 120 125

Tyr Lys Arg Leu Gln Arg Pro Thr Ile Lys Ala Lys Leu Val Lys Ser
 130 135 140

Thr Leu Gly Asp Leu Tyr His Tyr Met Gly Ser Ser Ala Pro Lys Tyr
 145 150 155 160

Leu Ala

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

Met Ala Asn Leu Met Met Arg Leu Pro Ile Ser Leu Arg Ser Phe Ser
 1 5 10 15

Val Ser Ala Ser Ser Ser Asn Gly Ser Pro Pro Val Ile Gly Gly Ser
 20 25 30

Ser Gly Gly Val Gly Pro Met Ile Val Glu Leu Pro Leu Glu Lys Ile
 35 40 45

0263-100-SEQ.ST25

Arg Arg Pro Leu Met Arg Thr Arg Ser Asn Asp Gln Asn Lys Val Lys
 50 55 60

Glu Leu Met Asp Ser Ile Arg Gln Ile Gly Leu Gln Val Pro Ile Asp
 65 70 75 80

Val Ile Glu Val Asp Gly Thr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Cys His Arg
 85 90 95

Tyr Glu Ala His Gln Lys Leu Gly Leu Pro Thr Ile Arg Cys Lys Ile
 100 105 110

Arg Lys Gly Thr Lys Glu Thr Leu Arg His His Leu Arg
 115 120 125

<210> 8

<211> 86

<212> PRT

<213> Thermosynechococcus elongatus

<400> 8

Met Arg Val Leu Asp Leu Pro Leu Asn Ala Ile Arg Arg Pro Leu Val
 1 5 10 15

Arg Gln Thr Asp Pro Ala Lys Val Ala Ala Leu Met Ala Ser Ile Ala
 20 25 30

Glu Ile Gly Gln Gln Glu Pro Ile Asp Val Leu Glu Val Glu Gly His
 35 40 45

Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Cys His Arg Tyr Glu Ala Cys Gln Arg Leu
 50 55 60

Gly Leu Pro Thr Ile Arg Ala Arg Val Arg Arg Ala Pro Arg Ser Val
 65 70 75 80

Leu Asn Leu His Leu Ala
 85

<210> 9

<211> 87

<212> PRT

<213> Nostoc sp

0263-100-SEQ.ST25

<400> 9

Met Val Arg Val Gln Glu Ile Pro Leu Asn Gln Ile Arg Arg Pro Leu
 1 5 10 15

Pro Arg Gly Asn Asp Pro Tyr Lys Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Ile
 20 25 30

Ala Ala Ile Gly Gln Gln Glu Pro Ile Asp Val Leu Glu Val Asp Gly
 35 40 45

Gln Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Cys His Arg Tyr Glu Ala Cys Gln Arg
 50 55 60

Leu Gly Lys Glu Thr Ile Leu Ala Arg Val Arg Lys Ala Pro Arg Ser
 65 70 75 80

Val Leu Lys Met His Leu Ala
 85

<210> 10

<211> 141

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 10

Met Ala Ala Ser Gly Phe Leu Leu Arg Cys Pro Ala Ala Pro Ser Ala
 1 5 10 15

Val Pro Leu Trp Gly Arg Ser Gly Arg Gly Gly Gly Gly Gly Leu Ala
 20 25 30

Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asn Gly Ala Ala Val Pro Ser Ser Leu Ser
 35 40 45

Asp Ser Glu Lys Lys Gly Pro Val Val Met Glu Ile Pro Leu Asp Lys
 50 55 60

Ile Arg Arg Pro Leu Met Arg Thr Arg Ala Asn Asp Pro Ala Lys Val
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Met Asp Ser Ile Arg Val Ile Gly Leu Gln Val Pro Ile
 85 90 95

Asp Val Leu Glu Val Asp Gly Val Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Cys His
 100 105 110

Arg Tyr Glu Ala His Gln Arg Leu Gly Leu Pro Thr Ile Arg Cys Lys
 115 120 125

0263-100-SEQ.ST25

Val Arg Arg Gly Thr Lys Glu Thr Leu Arg Ile Gly Cys
130 135 140

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 11
gtcccgcggc ggcggcgacg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 12
agcaggtgcc aaggaggctg

20

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 13
ttaattgaat tcatggggct gcgtgcagga gg

32

<210> 14

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial sequence

0263-100-SEQ.ST25

<220>

<223> amorce PCR

<400> 14

ttttcctttt gcggccgcct actactgcaa gtctggtgtg gatg

44

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.